

UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

Re: Application of: **Werner KNEBEL**
Serial No.: To Be Assigned
Filed: Herewith
For: **CARS MICROSCOPE AND METHOD FOR CARS
MICROSCOPY**

LETTER RE: PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

September 15, 2003

Sir:

Applicant hereby claims priority of German Application Serial No. 102 43 449.2, filed 19
September 2002.

Respectfully submitted,

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By 

William C. Gehris
Reg. No. 38,156

Davidson, Davidson & Kappel, LLC
485 Seventh Avenue, 14th Floor
New York, New York 10018
(212) 736-1940



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 43 449.2

Anmeldetag: 19. September 2002

Anmelder/Inhaber: Leica Microsystems Heidelberg GmbH,
Mannheim/DE

Bezeichnung: Cars-Mikroskop und Verfahren zur
Cars-Mikroskopie

IPC: G 01 J, G 02 B

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the President of the German Patent and Trademark Office.

Weller

CARS-Mikroskop und Verfahren zur CARS-Mikroskopie

Die Erfindung betrifft ein Mikroskop für die CARS-Mikroskopie mit Mitteln zur
5 Erzeugung eines Pumplichtstrahls und eines Stokeslichtstrahls, die koaxial
durch eine Mikroskopoptik auf eine Probe richtbar sind, und mit einem
Detektor zur Detektion des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur CARS-Mikroskopie.

In der Scanmikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um
10 das von der Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten.
Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahls wird mit Hilfe einer steuerbaren
Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in
einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht
aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung
15 ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von
Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt
kommenden Lichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahls
gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur
Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet.

20 Speziell in der konfokalen Scanmikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus
eines Lichtstrahls in drei Dimensionen abgetastet.

Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle,
eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die
sog. Anregungsblende - fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine

- Strahlableinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht
- 5 gelangt über die Strahlableinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch
- 10 sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatenaufnahme erzielt, wobei die Bahn des Abtastlichtstrahls auf bzw. in dem Objekt idealerweise einen Mäander beschreibt. (Abtasten einer Zeile in x-Richtung bei konstanter y-Position, anschließend x-Abtastung anhalten und per y-
- 15 Verstellung auf die nächste abzutastende Zeile schwenken und dann, bei konstanter y-Position, diese Zeile in negativer x-Richtung abtasten u.s.w.). Um eine schichtweise Bilddatenaufnahme zu ermöglichen, wird der Probenstisch oder das Objektiv nach dem Abtasten einer Schicht verschoben und so die nächste abzutastende Schicht in die Fokusebene des Objektivs gebracht.
- 20 Zur Detektion werden oft Spektraldetektoren verwendet, die beispielsweise als Multibanddetektoren ausgeführt sein können, wie sie beispielsweise die Deutsche Offenlegungsschrift DE 198 03 151.3 A1 offenbart.
- Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)-Mikroskopie ist eine Technik, die zunehmend an Bedeutung gewinnt. Ein großer Vorteil ist, dass die Proben
- 25 nicht mit Farbstoffen markiert werden müssen. Außerdem können lebende Zellen untersucht werden.
- Im Vergleich zur herkömmlichen Raman-Mikroskopie und der bekannten konfokalen Raman-Mikroskopie kann man bei der CARS-Mikroskopie eine höhere Ausbeute an Detektionslicht erzielen, störende Nebeneffekte besser
- 30 unterdrücken und das Detektionslicht leichter vom Beleuchtungslicht trennen. Für die konventionelle konfokale Raman-Spektroskopie wird ein Detektionsspinhole benötigt, um eine gute axiale Auflösung zu erreichen, sowie

ein hochauflösendes Spektrometer. CARS dagegen ist ein nichtlinearer optischer Prozess (Vierwellen-Mischprozess). Ähnlich, wie bei der Multiphotonen-Mikroskopie, bei der zwei oder mehr Photonen gleichzeitig absorbiert werden, wird, da die Wahrscheinlichkeit des Phasenrichtigen gleichzeitigen Zusammentreffens mehrerer Photonen im Fokus auf Grund der höheren Photonendichte am größten ist, kein Detektionsspinhole benötigt. Ohne Detektionsspinhole wird die gleiche axiale Auflösung erzielt wie bei der Multiphotonen-Mikroskopie. Für die CARS-Spektroskopie werden üblicherweise 2 Laser, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren (ν_P und ν_S , Pump- und Stokeslaser), benutzt, wobei ν_S durchstimmbar sein sollte, um ein CARS-Spektrum ν_{CARS} zu erzeugen ($\nu_{CARS} = 2\nu_P - \nu_S$, $I_{CARS} \sim (I_P)^2 \cdot I_S$). In Fig. 2 ist ein Termschema eines CARS-Übergangs schematisch dargestellt. Stimmt die Differenzfrequenz $\nu_P - \nu_S$ mit der Differenzfrequenz zwischen zwei molekularen Vibrationszuständen $|1\rangle$ und $|0\rangle$ in der Probe überein, so ist das CARS-Signal sogar noch verstärkt. Der Pumplichtstrahl und der Stokeslichtstrahl werden bei mikroskopischen Anwendungen coaxial vereinigt und gemeinsam auf dasselbe Probenvolumen fokussiert. Die Richtung, in der die Anti-Stokes-Strahlung emittiert wird, ergibt sich aus der Phasenanpassungsbedingung für den Vier-Wellen-Mischprozess, wie schematisch in Fig. 3 dargestellt ist.

Aus der US-Patentschrift 4,405,237 „Coherent anti-Stokes Raman device“ ist eine Vorrichtung bekannt, bei der zwei gepulste Laserstrahlen, die von zwei Lasern erzeugt werden und die unterschiedliche Wellenlängen im sichtbaren Bereich oder im UV-Bereich des Spektrums aufweisen, genutzt werden, um eine Probe simultan zu beleuchten. Bei geeigneter Wahl der Wellenlängen kann die Probe derart angeregt werden, dass sie die charakteristische Coherent anti-Stokes Raman-Strahlung emittiert.

Aus der US-Patentschrift US 5,194,912 „Raman analysis apparatus“ ist ein Mikroskop bekannt, das einen einstellbaren Interferenzfilter im Detektionsstrahlengang beinhaltet. Der Interferenzfilter ist derart einstellbar,

dass der Teil des Detektionslichtes, der die gewünschten Ramanlinien aufweist zum Detektor gelangt.

Aus der US-Patentschrift US 6,108,081 "Nonlinear vibrational microscopy" ist ein Verfahren und eine Vorrichtung zur mikroskopischen CARS-Spektroskopie bekannt. In dieser Patentschrift ist offenbart, mit einem Titan-Saphir-Laser einen Pumplichtstrahl und mit einem Optisch-Parametrischen-Oszillator einen Stokeslichtstrahl zu erzeugen, die mit einem dichroitischen Strahlvereiniger zu einem koaxialen Beleuchtungslichtstrahl vereinigt werden. Zusätzlich ist ein regenerativer Verstärker vorgesehen, um ausreichend hohe Pulsleistungen zu erzielen.

Deutliche Nachteile der bisherigen Technik liegen in den Einschränkungen der Anregungslichtquelle begründet, die üblicherweise sehr komplex ist, da sie aus einem Puls laser, meist einem Titan-Saphir-Laser, zusätzlich einem regenerativem Verstärker, was niedrige Repetitionsraten im kHz-Bereich unvermeidbar macht, und weiterhin einem aufwendigen und teuren Optisch-Parametrischen-Oszillator (OPO), der von einem Teilstrahl des Puls lasers gepumpt wird, besteht. Die bekannten Beleuchtungsanordnungen sind aufwendig, teuer und schwierig zu justieren; insbesondere die koaxiale Überlagerung von des Pumplichtstrahls und des Stokeslichtstrahls erfordert besonderen Justieraufwand, um zu gewährleisten, dass beide Strahlen auf dasselbe Probenvolumen fokussiert werden. Der zur Strahlvereinigung im Stand der Technik eingesetzte Strahlteiler ist, was einen weiteren Nachteil darstellt, nur für bestimmte Kombinationen von Pumplichtstrahlwellenlänge und Stokeslichtstrahlwellenlänge verwendbar. Bei Auswahl von anderen Wellenlängenkombinationen, muss der Strahlteiler aufwendig und langwierig gewechselt werden.

Ein weiterer Nachteil der bekannten Vorrichtungen ist der kleine verfügbare Wellenlängenbereich, der auch die Vielfalt der zu untersuchenden Proben einschränkt.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Mikroskop für die CARS-Mikroskopie anzugeben, das das Problem der koaxialen Strahlvereinigung

vermeidet, und mit dem Proben der unterschiedlichsten Art flexibel untersuchbar sind.

Diese Aufgabe wird durch ein Mikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Mittel zur Erzeugung des Pumplichtstrahls und des
5 Stokeslichtstrahls einen Laser und ein mikrostrukturiertes optisches Element umfassen, das das Licht des Lasers spektral verbreitert.

Es ist außerdem eine Aufgabe der Erfindung ein Verfahren zur CARS-Mikroskopie anzugeben, mit dem Proben der unterschiedlichsten Art flexibel untersuchbar sind.

10 Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, dass durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- Erzeugen eines Pumplichtstrahls und eines zu dem Pumplichtstrahl koaxial verlaufenden Stokeslichtstrahls mit Mitteln zur Erzeugung eines Pumplichtstrahls und eines Stokeslichtstrahls, wobei die Mittel zur
15 Erzeugung des Pumplichtstrahls und des Stokeslichtstrahls einen Laser und ein mikrostrukturiertes optisches Element umfassen, das das Licht des Lasers spektral verbreitert.
- Richten des Pumplichtstrahls und des Stokeslichtstrahls auf eine Probe,
- 20 • Detektieren des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes mit einem Detektor.

Die Erfindung hat den Vorteil, dass der Pumplichtstrahl und der Stokeslichtstrahl, da sie aus demselben mikrostrukturierten optischen Element austreten, immer koaxial verlaufen und eine aufwendige Strahlvereinigung
25 unnötig ist.

Wenn die Wellenlängen der CARS-Anregungsstrahlung in der Nähe der Ein-Photonen-Absorption der zu untersuchenden Moleküle liegen, wird die CARS-Emission durch Resonanzeffekte stark überhöht. Informationen über ein spezifisches Molekül werden mit Hilfe der Resonanzüberhöhung gewonnen.
30 Daher ist es extrem wichtig, dass die Wellenlängen des Pumplichtstrahls und

des Stokeslichtstrahls genau auf die passenden molekularen Übergänge abgestimmt werden, was mit dem erfindungsgemäßen Mikroskop einfach und flexibel ermöglicht ist.

Das mikrostrukturierte optische Element bietet den Vorteil, dass es bei
5 geeigneter Beleuchtung – beispielsweise mit dem Licht eines PulsLasers, der
als Ti:Saphir-Laser ausgeführt sein kann - Licht über einen großen
Wellenlängenbereich (ca. 400-1300 nm) mit kurzen Pulsen (fs oder ps) und
hoher Repetitionsrate emittiert. Kurze Pulse sind, da es sich bei CARS um
einen nichtlinearen Effekt handelt, bei dem die instantane Photonendichte
10 möglichst hoch sein sollte, von Vorteil. Eine hohe Repetitionsrate ist
vorzugsweise für die schnelle Aufnahme von Bildern vorteilhaft. Aus dem
Licht, das aus dem mikrostrukturierten optischen Element austritt, werden der
Pumplichtstrahl und der Stokeslichtstrahl mit einem vorzugsweise variablen
Filter extrahiert. Durch die simultane Erzeugung der Lichtpulse, treten diese
15 zeitlich genau gleichzeitig und in Phase aus dem mikrostrukturierten optischen
Element. Vorzugsweise sind Mittel zur Einstellung der Phase des
Pumplichtstrahls und/oder des Stokeslichtstrahls vorgesehen. Ein Ausgleich
von Verschiebungen aufgrund von Dispersionseffekten kann beispielsweise
mit einer Verzögerungsstrecke aus geeignetem optischen Material oder einer
20 Dispersionskompensation realisiert werden.

In einer bevorzugten Ausgestaltung sind Mittel zur Selektion des
Pumplichtstrahls und Mittel zur Selektion des Stokeslichtstrahls aus dem
spektral verbreiteten Licht vorgesehen. Vorzugsweise beinhalten die Mittel
zur Selektion ein akustooptisches Bauteil, das vorzugsweise als AOTF
25 (acousto-optical-tunable-filter) ausgeführt ist. In einer ganz besonders
bevorzugten Ausgestaltung lenkt das Mittel zu Selektion den Pumplichtstrahl
und den Stokeslichtstrahl zur Probe und von der Probe ausgehendes
Detektionslicht zu dem Detektor. Diese Ausgestaltung kann vorzugsweise
eine Vorrichtung, wie sie in der Deutschen Offenlegungsschrift DE 199 06 757
30 A1 offenbart ist, beinhalten. Eine solche Vorrichtung ist von ganz besonderem
Vorteil, da damit zwei beliebige Wellenlängen aus dem Weißlichtspektrum
gleichzeitig herausgeschnitten werden können. Die Wellenlängen können

auch separat durch Verstellen der HF-Frequenz variiert werden und die unerwünschten Anteile im Detektionsstrahlengang wirksam unterdrückt werden

Das Mittel zu Selektion ist in einer besonderen Ausführung derart einstellbar,
5 das Pumplichtstrahlen und/oder Stokeslichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen selektierbar sind. Vorzugsweise ist das Mittel zu Selektion kontinuierlich einstellbar.

10 In einer bevorzugten Ausgestaltung ist zumindest ein Filter vorgesehen, der aus dem von der Probe ausgehendem Detektionslicht Anteile der Wellenlänge des Pumplichtstrahls und des Stokeslichtstrahls herausfiltert, insbesondere um zu vermeiden, dass diese Anteile zum Detektor gelangen und die Messung verfälschen.

Das mikrostrukturierte optische Element ist in einer bevorzugten Ausgestaltung des Scanmikroskops aus einer Vielzahl von mikrooptischen
15 Strukturelementen aufgebaut, die zumindest zwei unterschiedliche optische Dichten aufweisen. Ganz besonders bevorzugt ist eine Ausgestaltung, bei der das optische Element einen ersten Bereich und einen zweiten Bereich beinhaltet, wobei der erste Bereich eine homogene Struktur aufweist und in dem zweiten Bereich eine mikroskopische Struktur aus mikrooptischen
20 Strukturelementen gebildet ist. Von Vorteil ist es außerdem, wenn der erste Bereich den zweiten Bereich umschließt. Die mikrooptischen Strukturelemente sind vorzugsweise Kanülen, Stege, Waben, Röhren oder Hohlräume.

Das mikrostrukturierte optische Element besteht in einer anderen Ausgestaltung aus nebeneinander angeordnetem Glas- oder
25 Kunststoffmaterial und Hohlräumen. Besonders zu bevorzugt ist die Ausführungsvariante, bei der das mikrostrukturierte optische Element aus Photonic-Band-Gap-Material besteht und als Lichtleitfaser ausgestaltet ist, wobei vorzugsweise eine optische Diode zwischen dem Laser und der Lichtleitfaser vorgesehen ist, die eine Rückreflexion des Lichtstrahls des
30 Lasers, die von den Enden der Lichtleitfaser herrührt, unterdrückt.

Eine ganz besonders bevorzugte und einfach zu realisierende

Ausführungsvariante beinhaltet als mikrostrukturiertes optisches Element eine herkömmliche Lichtleitfaser mit einem Faserkerndurchmesser von ca. 9 μm , die zumindest entlang eines Teilstücks eine Verjüngung aufweist. Lichtleitfasern dieser Art sind als sog. „tapered fibers“ bekannt. Vorzugsweise ist die Lichtleitfaser insgesamt 1 m lang und weist eine Verjüngung auf einer Länge von 30 mm bis 90 mm auf. Der Durchmesser der Lichtleitfaser beträgt in einer bevorzugten Ausgestaltung im Bereich der Verjüngung ca. 2 μm . Der Faserkerndurchmesser liegt entsprechend im Nanometerbereich.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausgestaltung ist das Mikroskop ein Scanmikroskop insbesondere ein konfokales Scanmikroskop. Es umfasst vorzugsweise eine Scaneinrichtung, die den Pumplichtstrahl und den Stokeslichtstrahl über die Probe führt. Es ist in einer bevorzugten Ausgestaltung vorgesehen, dass das Detektionslicht über die Scaneinrichtung, die beispielsweise als Anordnung von Galvanometerspiegeln ausgeführt sein kann, zum Detektor gelangt; das Mikroskop arbeitet in dieser Ausgestaltung in Descan-Anordnung. In einer anderen Ausgestaltung wird das Detektionslicht unter Auslassung der Scaneinrichtung zum Detektor geführt. Das Mikroskop arbeitet in dieser Ausgestaltung in Non-Descan-Anordnung. Da es sich bei CARS um einen Vier-Wellenmischprozess handelt, wird das Detektionslicht üblicherweise in Vorwärtsrichtung abgestrahlt und demnach vorzugsweise mit einem zusätzlichen nachgeschalteten Non-Descan-Detektor detektiert.

Der Detektor umfasst vorzugsweise einen Multibanddetektor oder ein Spektrometer. Eine mögliche Anregung ist die gleichzeitige Einstrahlung von 600nm und 800nm. Das CARS-Spektrum liegt dann typischerweise bei 480nm. Mit einem Multibanddetektor lässt sich dieses Spektrum problemlos von einer Hintergrundfluoreszenz und von den Anregungswellenlängen trennen.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der weitere Schritt des Selektierens eines Pumplichtstrahls und/oder eines Stokeslichtstrahls aus dem spektral verbreiterten Licht vorgesehen.

In einer besonders bevorzugten Ausführung wird ein Resonanzspektrum aufgenommen. Aus dem Resonanzspektrum kann eine Wellenlängenkombination von Pumplichtstrahl und Stokeslichtstrahl, bei der ein Resonanzmaximum existiert, ermittelt werden. Wenn die Probe mehrere unterschiedliche Substanzen beinhaltet, ist vorzugsweise vorgesehen, dass
5 zumindest für zwei Substanzen ein Resonanzmaximum ermittelt wird.

Für das Auffinden des CARS-Spektrums kann folgende Vorgehensweise eingesetzt werden: Im ersten Schritt werden in Descan-Anordnung λ -Scans aufgenommen. Dabei wird zunächst ν_P auf einen Übergang gesetzt und ν_S
10 durchgestimmt, bis die Wellenlänge gefunden ist, bei der maximale Resonanz ermittelt ist ($\nu_P - \nu_S$ stimmt dann mit der Differenzfrequenz zwischen zwei molekularen Vibrationszuständen $|1\rangle$ und $|0\rangle$ in der Probe überein). Danach wird, ein geeigneter Farbfilter oder Interferenzfilter ausgewählt, der genau auf ν_{CARS} abgestimmt ist, was möglich ist, da nun alle relevanten Wellenlängen genau
15 bekannt sind, und in Non-Descan-Detektion mit der 3-D-Bildaufnahme begonnen. In einem weiteren Schritt können beispielsweise mit einem Multibanddetektor mehrere Moleküle simultan vermessen werden. Auf die Weise erhält man ein Mehr-Kanal-CARS-Mikroskop. Das ist nur mit einem derartigen System möglich, da in dem Weißlicht alle Farbanteile (sogar im Infrarot) vorhanden sind, mit dem akustooptischen Bauteil schnell zwischen
20 allen möglichen Wellenlängen hin und her geschaltet werden kann und mit dem Multibanddetektor mit hoher Auflösung λ -Scans zum Auffinden der besten Parameter durchgeführt werden können. Vorzugsweise kann zur Aufnahme der λ -Scans ein verspiegeltes Objekt-Deckglas verwendet werden.
25 Dieses ist ganz besonders vorteilhaft, da das CARS-Signal im Wesentlichen in Vorwärtsrichtung, also in Richtung des Beleuchtungslichtstrahls, von der Probe emittiert wird. Die Signalausbeute in der rückwärtigen Richtung kann auf die Weise erheblich verstärkt werden. Idealerweise kann die Verspiegelung aus einem Kantenfilter bestehen, das die beiden
30 Anregungswellenlängen transmittiert und die CARS-Wellenlängen reflektiert.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen

Fig. 1 Ein Mikroskop für die CARS-Mikroskopie,

5 Fig. 2 Ein Termschema eines CARS-Überganges,

Fig. 3 Die Illustration des Vierwellenlängen-Mischprozesses.

Fig. 1 zeigt ein als konfokales Scanmikroskop 1 ausgebildetes Mikroskop, das einen Laser 2 zur Erzeugung eines Lichtstrahls 5 einer ersten Wellenlänge von 800 nm beinhaltet. Der Laser ist als modengekoppelter Titan-Saphir-Laser 3 ausgeführt. Der Lichtstrahl 5 wird mit einer Einkoppeloptik 7 in das Ende eines mikrostrukturierten optischen Elements 9 zur Wellenlängenveränderung fokussiert, das als Lichtleitfaser aus Photonic-Band-Gap-Material 11 ausgebildet ist. Zum Kollimieren des aus der Lichtleitfaser aus Photonic-Band-Gap-Material 11 austretenden, in der Wellenlänge verbreiteter Lichtstrahls 15, ist eine Auskoppeloptik 13 vorgesehen. Das Spektrum des in der Wellenlänge veränderten Lichtstrahls ist über den Wellenlängenbereich von 300 nm bis 1600 nm nahezu kontinuierlich, wobei die Lichtleistung über das gesamte Spektrum weitgehend konstant ist; lediglich im Bereich der ersten Wellenlänge von 800 nm ist eine drastische Leistungsüberhöhung zu verzeichnen. Der in der Wellenlänge verbreiterte Lichtstrahl 15 durchläuft als Mittel zur Unterdrückung 16 einen dielektrischen Filter 17, der in dem in der Wellenlänge verbreiterten Lichtstrahl 15 die Leistung des Lichtanteiles im Bereich der ersten Wellenlänge auf das Niveau der übrigen Wellenlängen des in der Wellenlänge veränderten Lichtstrahls reduziert. Anschließend wird der in der Wellenlänge veränderte Lichtstrahl mit der Optik 19 auf eine Beleuchtungsblende 21 fokussiert und gelangt anschließend zu einem Mittel 22 zur Selektion, das als ein akustooptisches Bauteil 23 (AOBS) ausgeführt ist und als Hauptstrahlteiler fungiert. Mit dem Mittel zur Selektion 22 werden ein Pumplichtstrahl 24 und ein Stokeslichtstrahl 26, je einer vom Benutzer vorgegeben Wellenlänge, selektiert. Vom Mittel zur Selektion 22 gelangen der Pumplichtstrahl 24 und der Stokeslichtstrahl 26, die koaxial verlaufen, zum

Scanspiegel 25, der diese durch die Scanoptik 27, die Tubusoptik 29 und das
Objektiv 31 hindurch über die Probe 33 führt. Das von der Probe 33
ausgehende Detektionslicht 35, das in der Zeichnung gestrichelt dargestellt
ist, gelangt bei Descan-Detektion durch das Objektiv 31, die Tubusoptik 29
5 und die Scanoptik 27 hindurch zurück zum Scanspiegel 25 und dann zum
Mittel zur Selektion 22, passiert dieses und wird nach Durchlaufen der
Detektionsblende 37 mit dem Detektor 39, der als Multibanddetektor
ausgeführt ist, detektiert. Für die Non-Descan-Detektion sind kondensorseitig
zwei weitere Detektoren 41, 43 vorgesehen. Das in Geradeausrichtung von
10 der Probe ausgehende Detektionslicht 45 wird von dem Kondensor 47
kollimiert und von dem dichroitischen Strahlteiler 49 in Abhängigkeit von der
Wellenlänge auf die weiteren Detektoren 41, 43 verteilt. Vor den Detektoren
sind Filter 51, 53 zur Unterdrückung der Anteile des Detektionslichts
vorgesehen, die die Wellenlängen des Pumplichtstrahls 24 bzw. des
15 Stokeslichtstrahls 26 oder anderes unerwünschtes Fluoreszenzlicht
aufweisen.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform
beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und
Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich
20 der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

	1	konfokales Scanmikroskop
	2	Laser
5	3	modengekoppelter Titan-Saphir-Laser
	5	Lichtstrahl
	7	Einkoppeloptik
	9	mikrostrukturiertes optisches Element
	11	Photonic-Band-Gap-Material
10	13	Auskoppeloptik
	15	in der Wellenlänge verbreiteter Lichtstrahl
	16	Mittel zur Unterdrückung
	17	Filter
	19	Optik
15	21	Beleuchtungsblende
	22	Mittel zur Selektion
	23	akustooptisches Bauteil
	24	Pumplichtstrahl
	25	Scanspiegel
20	26	Stokeslichtstrahl
	27	Scanoptik
	29	Tubusoptik
	31	Objektiv
	33	Probe
25	35	Detektionslicht

	37	Detektionsblende
	39	Detektor
	41	weiterer Detektor
	43	weiterer Detektor
5	45	Detektionslicht
	47	Kondensor
	49	Strahlteiler
	51	Filter
	53	Filter

Patentansprüche

1. Mikroskop für die CARS-Mikroskopie mit Mitteln zur Erzeugung eines Pumplichtstrahls und eines Stokeslichtstrahls, die koaxial durch eine Mikroskopoptik auf eine Probe richtbar sind, und mit einem Detektor zur
5 Detektion des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Erzeugung des Pumplichtstrahls und des Stokeslichtstrahls einen Laser und ein mikrostrukturiertes optisches Element umfassen, das das Licht des Lasers spektral verbreitert.
2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der
10 Laser ein Puls laser ist.
3. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zur Selektion des Pumplichtstrahls aus dem spektral verbreiterten Licht vorgesehen sind.
4. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch
15 gekennzeichnet, dass Mittel zur Selektion des Stokeslichtstrahls aus dem spektral verbreiterten Licht vorgesehen sind.
5. Mikroskop nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Selektion ein akustooptisches Bauteil beinhalten.
- 20 6. Mikroskop nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das akustooptische Bauteil ein AOTF ist.
7. Mikroskop nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zu Selektion den Pumplichtstrahl und den Stokeslichtstrahls zur Probe und von der Probe ausgehendes Detektionslicht
25 zu dem Detektor lenkt.
8. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zu Selektion derart einstellbar ist, dass Pumplichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen selektierbar sind.

9. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zu Selektion derart einstellbar ist, dass Stokeslichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen selektierbar sind.
10. Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zu Selektion kontinuierlich einstellbar ist.
11. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass ein Filter vorgesehen ist, der aus dem von der Probe ausgehendem Detektionslicht Anteile der Wellenlänge des Pumplichtstrahls und des Stokeslichtstrahls herausfiltert.
12. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zur Einstellung der Phase des Pumplichtstrahls und/oder des Stokeslichtstrahls vorgesehen sind.
13. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das mikrostrukturierte optische Element aus einer Vielzahl von mikrooptischen Strukturelementen aufgebaut ist, die zumindest zwei unterschiedliche optische Dichten aufweisen.
14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das mikrostrukturierte optische Element einen ersten Bereich und einen zweiten Bereich beinhaltet, wobei der erste Bereich eine homogene Struktur aufweist und in dem zweiten Bereich eine Mikrostruktur aus mikrooptischen Strukturelementen gebildet ist.
15. Mikroskop nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich den zweiten Bereich umschließt.
16. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das mikrostrukturierte optische Element aus nebeneinander angeordnetem Glas- oder Kunststoffmaterial und Hohlräumen besteht.
17. Mikroskop nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die mikrooptischen Strukturelemente Kanülen, Stege, Waben, Röhren oder Hohlräume sind.

18. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das mikrostrukturierte optische Element aus Photonic-Band-Gap-Material besteht.
19. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch
5 gekennzeichnet, dass das mikrostrukturierte optische Element als Lichtleitfaser ausgestaltet ist.
20. Mikroskop nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtleitfaser eine Verjüngung aufweist.
21. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch
10 gekennzeichnet, dass das Mikroskop eine Scaneinrichtung umfasst.
22. Mikroskop nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Scaneinrichtung eine Strahlableitvorrichtung umfasst, die den Pumplichtstrahl und den Stokeslichtstrahl über die Probe führt.
23. Mikroskop nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet,
15 dass der Detektor in Descan-Anordnung arbeitet.
24. Mikroskop nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor in Non-Descan-Anordnung arbeitet.
25. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor ein Multibanddetektor ist.
26. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch
20 gekennzeichnet, dass der Detektor ein Spektrometer umfasst.
27. Verfahren zur CARS-Mikroskopie gekennzeichnet durch folgende Schritte:
- Erzeugen eines Pumplichtstrahls und eines zu dem Pumplichtstrahl
25 koaxial verlaufenden Stokeslichtstrahls mit Mitteln zur Erzeugung eines Pumplichtstrahls und eines Stokeslichtstrahls, wobei die Mittel zur Erzeugung des Pumplichtstrahls und des Stokeslichtstrahls einen Laser und ein mikrostrukturiertes optisches Element umfassen, das das Licht des Lasers spektral verbreitert.

- Richten des Pumplichtstrahls und des Stokeslichtstrahls auf eine Probe,
 - Detektieren des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes mit einem Detektor.
- 5 28. Verfahren nach Anspruch 27, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:
- Selektieren eines Pumplichtstrahls aus dem spektral verbreiterten Licht.
- 10 29. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 oder 28, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:
- Selektieren eines Stokeslichtstrahls aus dem spektral verbreiterten Licht.
- 15 30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Selektieren ein kontinuierliches Variieren der Wellenlänge des Stokeslichtstrahls umfasst.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 30, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:
- Aufnehmen eines Resonanzspektrums.
- 20 31. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 31, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:
- Ermitteln der Wellenlängenkombination von Pumplichtstrahl und Stokeslichtstrahl bei der ein Resonanzmaximum existiert.
- 25 32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mehrere unterschiedliche Substanzen beinhaltet und dass zumindest für zwei Substanzen ein Resonanzmaximum ermittelt wird.
33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektionslicht mehrere Wellenlängen aufweist, die simultan getrennt voneinander detektiert werden.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass das mikrostrukturierte optische Element aus einer Vielzahl von mikrooptischen Strukturelementen aufgebaut ist, die zumindest zwei unterschiedliche optische Dichten aufweisen.
- 5 35. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass das mikrostrukturierte optische Element einen ersten Bereich und einen zweiten Bereich beinhaltet, wobei der erste Bereich eine homogene Struktur aufweist und in dem zweiten Bereich eine Mikrostruktur aus mikrooptischen Strukturelementen gebildet ist.
- 10 36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich den zweiten Bereich umschließt.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass das mikrostrukturierte optische Element aus nebeneinander angeordnetem Glas- oder Kunststoffmaterial und Hohlräumen besteht.
- 15 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass die mikrooptischen Strukturelemente Kanülen, Stege, Waben, Röhren oder Hohlräume sind.
39. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 38, dadurch gekennzeichnet, dass das mikrostrukturierte optische Element aus Photonic-Band-Gap-Material besteht.
- 20 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 39, dadurch gekennzeichnet, dass das mikrostrukturierte optische Element als Lichtleitfaser ausgestaltet ist.
- 25 41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtleitfaser eine Verjüngung aufweist.

Zusammenfassung

Ein Mikroskop für die CARS-Mikroskopie mit Mitteln zur Erzeugung eines Pumplichtstrahls und eines Stokeslichtstrahls, die koaxial durch eine Mikroskopoptik auf eine Probe richtbar sind, und mit einem Detektor zur
5 Detektion des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes ist offenbart. Das Mikroskop ist dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Erzeugung des Pumplichtstrahls und des Stokeslichtstrahls einen Laser beinhalten und ein mikrostrukturiertes optisches Element umfassen, das das Licht des Lasers spektral verbreitert.

10

Fig. 1

15

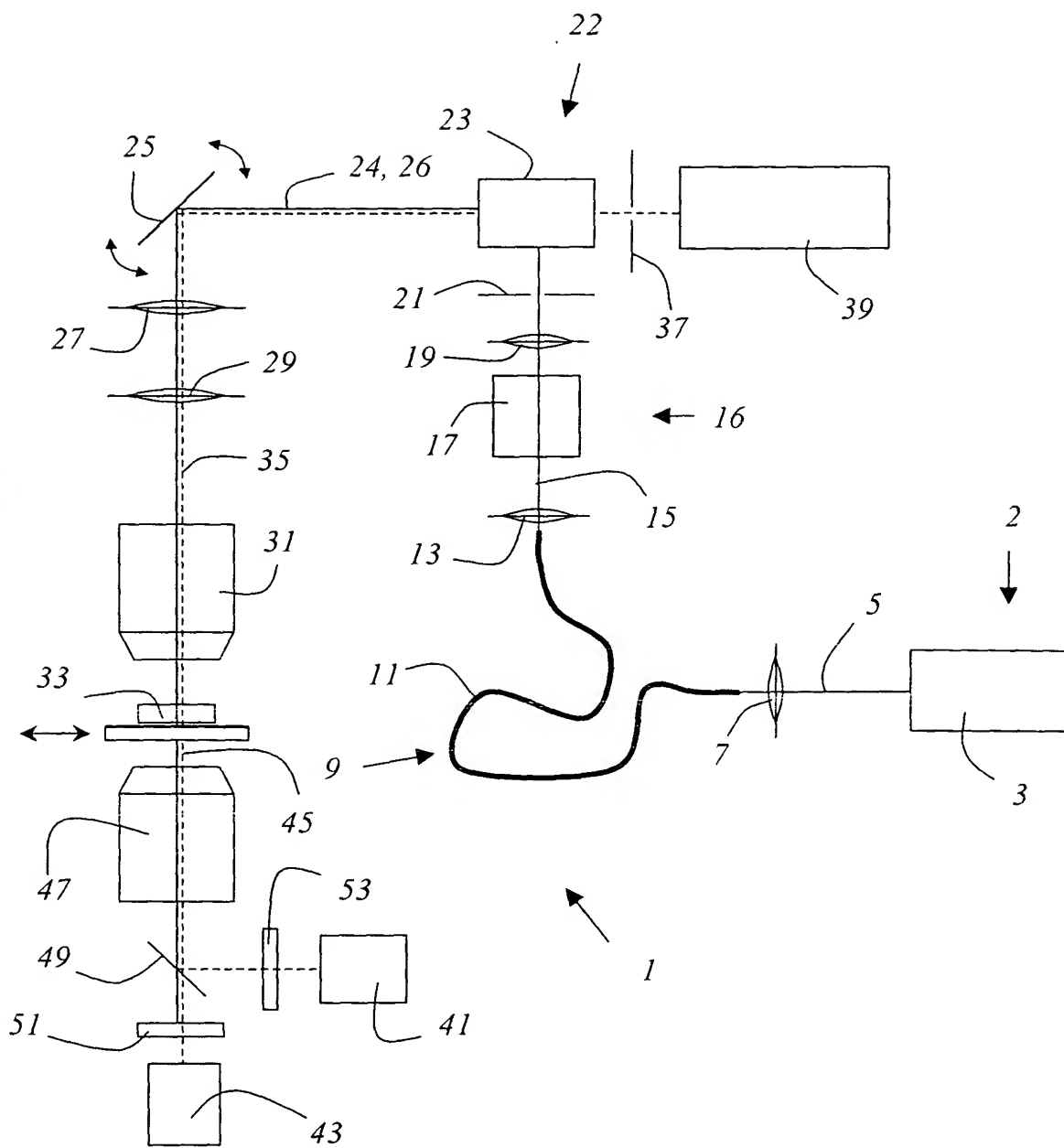


Fig. 1

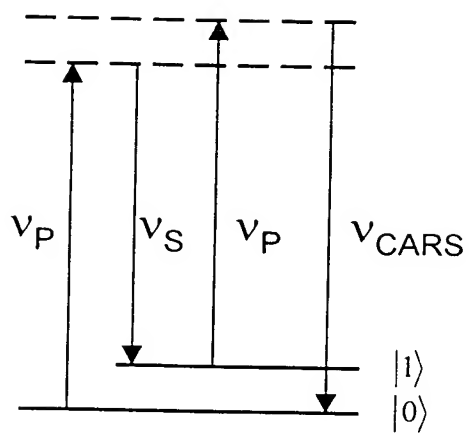


Fig. 2

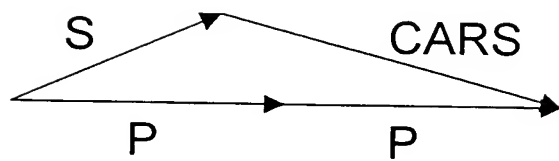


Fig. 3